

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

13.11.03

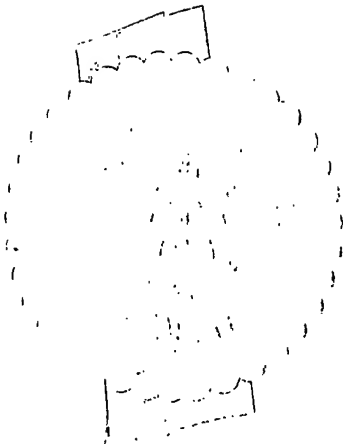
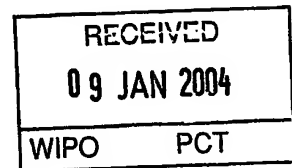
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 2月12日
Date of Application:

出願番号 特願2003-033641
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP2003-033641]

出願人 東洋紡績株式会社
Applicant(s):

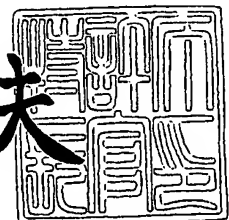


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年12月22日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 CN03-0095

【提出日】 平成15年 2月12日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

【氏名】 岸本 高英

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

【氏名】 曾我部 敦

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

【氏名】 岡 正則

【特許出願人】

【識別番号】 000003160

【氏名又は名称】 東洋紡績株式会社

【代表者】 津村 準二

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 000619

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 安定化されたザルコシンオキシダーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも 1 個のアミノ酸を付加、欠失、挿入あるいは置換により変換した蛋白質であって、ザルコシンオキシダーゼ活性を有し、液状での安定性が変換前に比べて向上していることを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項 2】 ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも 1 個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換していることを特徴とする請求項 1 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項 3】 ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が、配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列と 50% 以上の相同性を有する、請求項 1～2 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項 4】 ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が、配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有する、請求項 1～2 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項 5】 ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が、配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列を有する、請求項 1～2 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項 6】 配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 155 位～250 位間に対応する部位の少なくとも 1 つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする請求項 3～5 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項 7】 配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 82 位～92 位、または、354 位～366 位間に対応する部位の少なくとも 1 つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする請求項 3～5 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項 8】 配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 89 位、155 位、166 位、204 位、213 位、233 位、240 位、250 位、364 位に対応する部位からなる群より選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が他のアミ

ノ酸に置換されてされていることを特徴とする請求項 3～5 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項 9】配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 89 位のリジンがアルギニンに置換されてされていることを特徴とする請求項 3～5 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項 10】配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 155 位のシステインがイソロイシンに置換されてされていることを特徴とする請求項 3～5 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項 11】配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 166 位のアスパラギンがリジンに置換されてされていることを特徴とする請求項 3～5 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項 12】配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 204 位のメチオニンがアラニンに置換されてされていることを特徴とする請求項 3～5 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項 13】配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 213 位のセリンがプロリンに置換されてされていることを特徴とする請求項 3～5 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項 14】配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 233 位のシステインがセリンに置換されてされていることを特徴とする請求項 3～5 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項 15】配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 240 位のアスパラギンがチロシンに置換されてされていることを特徴とする請求項 3～5 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項 16】配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 250 位のグルタミン酸がグルタミンに置換されてされていることを特徴とする請求項 3～5 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項 17】配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 364 位のアラニンがバリンに置換されてされていることを特徴とする請求項 3～5 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

【請求項 18】請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載される改変型ザルコシンオキシダーゼをコードする遺伝子。

【請求項 19】請求項 18 に記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項 20】請求項 19 に記載のベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項 21】請求項 20 に記載の形質転換体を培養し、該培養物からザルコシンオキシダーゼを採取することを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼの製造法。

【請求項 22】請求項 1～17 項のいずれか 1 項に記載されるザルコシンオキシダーゼを含むクレアチン測定用試薬。

【請求項 23】請求項 1～17 項のいずれか 1 項に記載されるザルコシンオキシダーゼを含むクレアチニン測定用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を蛋白工学的手法により改変することにより得られる、液状での安定性が向上したザルコシンオキシダーゼ、その製造法および用途に関する。

【0002】

【従来の技術】

ザルコシンオキシダーゼ (EC 1.5.3.1) は、臨床的に筋疾患、腎疾患の診断の指標となっている体液中のクレアチン、クレアチニンの測定用酵素として、他の酵素、例えばクレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、ペルオキシダーゼと共に使用されている。ザルコシンオキシダーゼは基質であるザルコシンに水、酸素の存在下で作用して、グリシン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成する。

【0003】

このようなザルコシンオキシダーゼは、バチルス属、コリネバクテリウム属、シリンドロカルボン属、シュードモナス属、アースロバクター属等の細菌が生産することが知られている (例えば、特許文献 1～5 および非特許文献 1 参照。) 。また、これら生産菌のザルコシンオキシダーゼ遺伝子を、遺伝子工学的手法に

より、大腸菌等の宿主を用いた大量生産する技術についても報告されている（例えば、特許文献6～8参照。）。

【0004】

近年の臨床診断試薬の液状化に伴い、試薬成分の液状での安定化法が種々検討されているが、クレアチニンやクレアチン測定試薬に用いられるザルコシンオキシダーゼについても液状での安定性に優れたものが望まれている。我々のグループは、以前に野生型ザルコシンオキシダーゼを蛋白質工学的に改変し、金属イオンに対して安定性の向上した変異型ザルコシンオキシダーゼを報告した（例えば、特許文献9参照。）が、診断薬試薬中での長期保存安定性については更なる改良が期待されている。

本発明は、液状での安定性が向上した改変型ザルコシンオキシダーゼを提供することを目的とする。

【0005】

【特許文献1】

特開昭54-52789号公報

【特許文献2】

特開昭61-162174号公報

【特許文献3】

特開昭56-92790号公報

【特許文献4】

特開昭60-43379号公報

【特許文献5】

特開平2-265478号公報

【特許文献6】

特開平5-115281号公報

【特許文献7】

特開平6-113840号公報

【特許文献8】

特開平8-238087号公報

【特許文献 9】

特開平 7-163341 号公報

【非特許文献 1】

「J. Biochem.」, 1981 年, 89 巻, p. 599

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討した結果、ザルコシンに対する作用性を損なわずに、液状での安定性が向上した改変型ザルコシンオキシダーゼを造成できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0007】

すなわち、本発明は以下のような構成から成る。

項 1. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも 1 個のアミノ酸を付加、欠失、挿入あるいは置換により変換した蛋白質であって、ザルコシンオキシダーゼ活性を有し、液状での安定性が変換前に比べて向上していることを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 2. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも 1 個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換していることを特徴とする項 1 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 3. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が、配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列と 50% 以上の相同性を有する、項 1～2 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 4. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が、配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有する、項 1～2 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 5. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が、配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列を有する、項 1～2 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 6. 配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 155 位～250 位間に対応する部位の少なくとも 1 つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている

ことを特徴とする 項 3～5 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 7. 配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 82 位～92 位、または、354 位～366 位間に対応する部位の少なくとも 1 つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする 項 3～5 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 8. 配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 89 位、155 位、166 位、204 位、213 位、233 位、240 位、250 位、364 位に対応する部位からなる群より選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されてされていることを特徴とする 項 3～5 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 9. 配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 89 位のリジンがアルギニンに置換されてされていることを特徴とする 項 3～5 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 10. 配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 155 位のシステインがイソロイシンに置換されてされていることを特徴とする 項 3～5 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 11. 配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 166 位のアスパラギンがリジンに置換されてされていることを特徴とする 項 3～5 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 12. 配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 204 位のメチオニンがアラニンに置換されてされていることを特徴とする 項 3～5 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 13. 配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 213 位のセリンがプロリンに置換されてされていることを特徴とする 項 3～5 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 14. 配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 233 位のシステインがセリンに置換されてされていることを特徴とする 項 3～5 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 15. 配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 240 位のアスパ

ラギンがチロシンに置換されてされていることを特徴とする 項3～5記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項16. 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列の250位のグルタミン酸がグルタミンに置換されてされていることを特徴とする 項3～5記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項17. 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列の364位のアラニンがバリンに置換されてされていることを特徴とする 項3～5記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項18. 項1～17のいずれか1項に記載される改変型ザルコシンオキシダーゼをコードする遺伝子。

項19. 項18に記載の遺伝子を含むベクター。

項20. 項19に記載のベクターで形質転換された形質転換体。

項21. 項20に記載の形質転換体を培養し、該培養物からザルコシンオキシダーゼを採取することを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼの製造法。

項22. 項1～17項のいずれか1項に記載されるザルコシンオキシダーゼを含むクレアチン測定用試薬。

項23. 項1～17項のいずれか1項に記載されるザルコシンオキシダーゼを含むクレアチニン測定用試薬。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼは、臨床検査分野におけるクレアチン、クレアチニンの分析に有用である。

【0009】

本願発明の一実施態様は、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸を付加、欠失挿入あるいは置換により変換した蛋白質であって、ザルコシンオキシダーゼ活性を有し、液状での安定性が変換前に比べて向上していることを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼである。

【0010】

本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼは、液状での安定性が改変前に比べて向上していることを特徴とする。本発明における液状での安定性とは、例えば適当な緩衝液中に該改変型酵素を溶解して、適当な温度で一定期間保存した後の残存酵素活性の比率を意味する。

「適当な緩衝液」は、ザルコシンオキシダーゼの至適pHであるpH 7～8付近で十分な緩衝能を持つよう、その種類と濃度を選べば特に限定されないが、好ましくは50 mMのリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)、または、50 mMのPIPES-NaOH緩衝液(pH 7.5)が選択される。緩衝液には、さらに必要により界面活性剤、塩類、キレート剤、防腐剤などを含んでいてもよい。

「適当な温度で一定期間保存」の条件は特に限定されないが、好ましくは、液状診断薬試薬中での長期保存安定性を念頭に置いた加速(苛酷)試験の条件が選択される。具体的には、「40℃、3日間保存」、または、「60℃、30分間保存」などが挙げられる。時間が許せば、液状診断薬中が実際に長期保存される温度として汎用される2℃～10℃の冷蔵条件下で6ヶ月以上の保存を選択してもよい。

保存における、ザルコシンオキシダーゼの濃度は、特に限定されないが、通常の診断試薬に使用される濃度を想定した1～30 U/mlが好ましく選択される。さらに好ましくは5～20 U/mlである。

「安定性が改変前に比べて向上している」とは、一定期間保存後の活性保持率が、同条件で測定した改変前酵素の活性保持率と比べて高いことをいう。

【0011】

本発明の一実施態様としては、50 mMのリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)中で60℃、30分間保存した後の残存酵素活性率が、改変前に比べて向上した改変型ザルコシンオキシダーゼである。別な実施態様としては、2 mMのEDTA、50 mMのNaCl、0.1% (W/V)の2-メチルイソチアゾロン、0.1% (W/V)のトリトンX-100を含む50 mMのPIPES-NaOH緩衝液(pH 7.5)中で40℃、3日間保存した後の残存酵素活性率が、改変前に比べて向上した改変型ザルコシンオキシダーゼである。

【0012】

本発明の改変に使用するザルコシンオキシダーゼは特に限定されるものではなく、例えば公知のバチルス属やシュードモナス属、コリネバクテリウム属等に由来するザルコシンオキシダーゼを用いることができる。

【0013】

本発明では一例として、アースロバクター・エスピーTE1826（微工研菌寄第10637号）のザルコシンオキシダーゼを用いた（例えば、特許文献10参照。）。本発明者らのグループは、既に、アースロバクター・エスピーTE1826より抽出した染色体DNAよりザルコシンオキシダーゼ遺伝子の単離に成功し、そのDNAの全構造を決定し（例えば、非特許文献2参照。）、本ザルコシンオキシダーゼを遺伝子工学的手法によって形質転換体に高生産させることに成功し、高純度なザルコシンオキシダーゼを安価に大量供給することを可能にしている（例えば、特許文献11参照。）。アースロバクター・エスピーTE1826のザルコシンオキシダーゼのアミノ酸配列を、配列表の配列番号1に示す。また、これらのアミノ配列をコードするDNA配列を、配列表の配列番号2に示す。

但し、本発明は配列番号1に記載されるアミノ酸配列を有するザルコシンオキシダーゼを改変したものに限定されるものでなく、他のザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を改変したものであってもよい。他のザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質の好適な例として、配列番号1に記載されるアミノ酸配列を有するザルコシンオキシダーゼと立体構造が類似したザルコシンオキシダーゼ、具体的にはアミノ酸配列の相同性が50%以上である、更に好ましくはアミノ酸配列の相同性が80%以上である、他のザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が挙げられる。これはアミノ酸配列において50%乃至は80%以上の相同性を有し、同じ触媒活性を示す酵素蛋白質の場合、立体構造においても通常、類似性が高く、基質特異性に関与するアミノ酸残基や反応メカニズムが同じである場合が多いことを根拠とする。

また、本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼは、本願発明の酵素特性の本質である安定性が損なわれない範囲で、更に1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたものであっても良い。具体例には、ザルコシンオキシダー

ゼの精製を簡素化するためにアミノ酸配列のN末端側、又はC末端側にヒスチジンを付加したものが例示される（例えば、非特許文献3参照）。

なお、本発明におけるアミノ酸配列の相同性は、公知の遺伝子解析ソフトなどを用いて求めることができる。ここで相同性とは比較対象とするアミノ酸配列と類似性を有する範囲において、一致するアミノ酸残基のパーセンテージをいう。

【0014】

【特許文献10】

特開平2-265478号公報

【特許文献11】

特開平6-113840号公報

【非特許文献2】

「Journal of Fermentation and Bioengineering」, 1993年, 75巻4号
p. 239-244

【非特許文献3】

「実験医学」, 2002年, 20巻, p479-482

【0015】

本願発明の別の実施態様は、配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換していることを特徴とする、液状での安定性が変換前に比べて向上している改変型ザルコシンオキシダーゼである。

【0016】

本願発明の別の実施態様は、配列表の配列番号1に記載されるアースロバクター・エスピーTE1826のアミノ酸配列の155位～250位、若しくは、アースロバクター・エスピーTE1826以外のザルコシンオキシダーゼにおいて配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列の155位～250位に対応する部位の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする、液状での安定性が変換前に比べて向上している改変型ザルコシンオキシダーゼである。

【0017】

本願発明の別の実施態様は、配列表の配列番号 1 に記載されるアースロバクター・エスピー TE 1826 のアミノ酸配列の 82 位～92 位、もしくは、アースロバクター・エスピー TE 1826 以外のザルコシンオキシダーゼにおいて配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 82 位～92 位に対応する部位の少なくとも 1 つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする、液状での安定性が変換前に比べて向上している改変型ザルコシンオキシダーゼである。

X 線結晶解析により立体構造が明らかにされているザルコシンオキシダーゼの報告がある（例えば、非特許文献 4 参照）。その報告によれば、該ザルコシンオキシダーゼは配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列と同一性を有し、アースロバクター・エスピー TE 1826 のザルコシンオキシダーゼのアミノ酸配列である配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 82 位～92 位、若しくは、アースロバクター・エスピー TE 1826 以外のザルコシンオキシダーゼにおいて配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 82 位～92 位に対応する部位が、ザルコシンオキシダーゼの触媒ドメインと FAD 結合ドメインの連結部位を構成すると推察される。

【0018】

本願発明の別の実施態様は、配列表の配列番号 1 に記載されるアースロバクター・エスピー TE 1826 のアミノ酸配列の 364 位を含む α ヘリックスを構成すると推察される 354 位～366 位若しくはアースロバクター・エスピー TE 1826 以外のザルコシンオキシダーゼにおいて配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 354 位～366 位に対応する部位の間の少なくとも 1 つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする液状での安定性が変換前に比べて向上している改変型ザルコシンオキシダーゼである。

【非特許文献 4】

「Structure」, 1999 年, 7 巻 3 号, p. 331-345

【0019】

好ましくは、配列表の配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 89 位、155 位、166 位、204 位、213 位、233 位、240 位、250 位、364 位

、若しくは他のザルコシンオキシダーゼの対応する部位からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている改変型ザルコシンオキシダーゼである。

【0020】

更に好ましくは、次の群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている改変型ザルコシンオキシダーゼである。配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列の89位のリジンがアルギニンに置換、155位のシステインがイソロイシンに置換、166位のアスパラギンがリジンに置換、204位のメチオニンがアラニンに置換、213位のセリンがプロリンに置換、233位のシステインがセリンに置換、240位のアスパラギンがチロシンに置換、250位のグルタミン酸がグルタミンに置換、364位のアラニンがバリンに置換。

【0021】

本願発明の別の実施態様は、上記の改変型ザルコシンオキシダーゼをコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体、さらには、該形質転換体を培養し、該培養物からザルコシンオキシダーゼを採取することを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼの製造法である。

【0022】

本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼの製造方法は、特に限定されないが、以下に示すような手順で製造することが可能である。ザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質を構成するアミノ酸配列を改変する方法としては、通常行われる遺伝情報を改変する手法が用いられる。すなわち、タンパク質の遺伝情報を有するDNAの特定の塩基を変換することにより、或いは特定の塩基を挿入または欠失させることにより、改変蛋白質の遺伝情報を有するDNAが作成される。DNA中の塩基を変換する具体的な方法としては、例えば市販のキット (Transformer Mutagenesis Kit; Clontech製, EXOIII/Mung Bean Deletion Kit; Stratagene製, QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit; Stratagene製など) の使用、或いはポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) の利用が挙げられる。

【0023】

作製された改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAは、プラスミドと連結された状態にて宿主微生物中に移入され、改変タンパク質を生産する形質転換体となる。この際のプラスミドとしては、例えば、エシェリヒア・コリー (*Escherichia coli*) を宿主微生物とする場合にはpBluescript, pUC18などが使用できる。宿主微生物としては、例えば、エシェリヒア・コリー W3110、エシェリヒア・コリーC600、エシェリヒア・コリーJM109、エシェリヒア・コリーDH5 α などが利用できる。宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組換えDNAの移入を行なう方法などを採用することができ、更にエレクトロポレーション法を用いても良い。更には、市販のコンピテントセル (例えば、コンピテントハイJM109; 東洋紡績製) を用いても良い。

【0024】

こうして得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量の改変タンパク質を安定して生産し得る。形質転換体である宿主微生物の培養形態は宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、通常多くの場合は液体培養で行うが、工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、フラクトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。培養温度は菌が発育し、改変蛋白質を生産する範囲で適宜変更し得るが、エシェリヒア・コリーの場合、好ましくは20~42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、改変タンパク質が最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を終了すればよく、通常は6~48時間程度である。培地pHは菌が発育し改変タンパク質を生産する範囲で適宜変更し得るが、特に好ましくはpH6.0~9.0程度である。

【0025】

培養物中の改変タンパク質を生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し利用することもできるが、一般には常法に従って改変タンパク質が培養液中に存在する場合は、濾過、遠心分離などにより、改変タンパク質含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。改変タンパク質が菌体内に存在する場合には、得られた培養物から濾過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いでこの菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的で破壊し、また必要に応じてEDTA等のキレート剤及びまたは界面活性剤を添加して改変タンパク質を可溶化し、水溶液として分離採取する。

【0026】

この様にして得られた改変タンパク質含有溶液を、例えば、減圧濃縮、膜濃縮、更に硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、或いは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈澱法により沈澱せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。吸着剤或いはゲル濾過剤などによるゲル濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーにより、精製された改変タンパク質を得ることができる。

【0027】

本願発明の別の実施態様は、上記の改変型ザルコシンオキシダーゼを含むクレアチン測定用試薬、および、クレアチニン測定試薬である。本願発明のクレアチン測定用試薬、および、クレアチニン測定試薬は、液状安定性を向上させた改変型ザルコシンオキシダーゼを用いることにより、該試薬の有効期間の延長、或いは測定精度を向上させることができる。

【0028】

本発明のクレアチン測定試薬は、上記の液状での安定性が向上した改変型ザルコシンオキシダーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ペルオキシダーゼ、および過酸化水素検出試薬を含む。また、クレアチニン測定試薬は、上記の液状での安定性が向上した改変型ザルコシンオキシダーゼ、クレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ペルオキシダーゼ、および過酸化水

素検出試薬を含む。過酸化水素検出試薬とは、改変型ザルコシンオキシダーゼにより生成する過酸化水素をペルオキシダーゼの存在下で、生成色素として測定する試薬であり、酸化系発色試薬及び必要に応じて4-アミノアンチピリンや3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンなどのカップラーである。本発明の過酸化水素測定試薬は、各種の市販のものなどを用いることができるが、特に限定されるものではない。更に上記のクレアチンまたはクレアチニン測定試薬は、金属塩、蛋白質、アミノ酸、糖類、有機酸などを安定化剤として使用することもできる。また通常、試薬性能に悪影響を及ぼさない範囲で防腐剤や界面活性剤を添加し、適当な緩衝液と共に使用される。緩衝液の種類、濃度およびpHは、各試薬成分の保存および酵素反応など目的に応じて一種もしくは複数が選択されるが、いずれの緩衝液を用いるに際しても、酵素反応時のpHとしては5.0～10.0の範囲で使用されることが好ましい。

【0029】

本発明において、ザルコシンオキシダーゼ活性の測定は以下の条件で行う。

<試薬>

- 100mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) (200mM ザルコシンおよび0.1% トリトンX-100を含む)
- 0.1% 4-アミノアンチピリン
- 0.1% フェノール
- 25U/ml ペルオキシダーゼ

<測定条件>

上記トリス塩酸緩衝液、4-アミノアンチピリン溶液、フェノール溶液、ペルオキシダーゼ溶液を5:1:2:2の比率で混合し反応混液を調製する。反応混液1mlを試験管に採り、37℃で約5分間中予備加温した後、酵素溶液0.05mlを添加し、反応を開始させる。37℃で正確に10分間反応させた後、0.25% SDS水溶液2.0mlを加えて反応を停止させ、この液の500nmの吸光度を測定する。盲検は酵素溶液の代わりに蒸留水を試薬混液に加えて、以下同様の操作で吸光度を測定する。上記条件下で1分間に1マイクロモルの過酸化水素を生成する酵素量を1単位とする。また、プロリンに対する反応性は、上

記試薬中のザルコシンを同じ濃度のＬ－プロリンに置き換えた場合の活性の相対比として測定した。

【0030】

【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明する。

しかし、本発明はこれらに限定されるものではない。たとえば、後述の実施例 3 で示された 13 種類の改変型ザルコシンオキシダーゼのうち、SAOM1 は、配列表・配列番号 1 に記載されたアミノ酸配列の 89 位のリジンがアルギニンに置換された変異体であるが、該変異体の性能に実質的な影響を与えない範囲で、さらに、1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されていてもさしつかえない。SAOM1 以外の変異体についても同様である。

実施例 1 ザルコシンオキシダーゼの発現プラスミドの構築

アースロバクター・エスピー TE1826 由来ザルコシンオキシダーゼの発現プラスミド pSAOEP3 は、特開平 7-163341 記載の方法に従って構築した。本発現プラスミドは、PUC18 のマルチクローニングサイトに、TE1826 のザルコシンオキシダーゼをコードする遺伝子を含む約 1.7 Kbp の挿入 DNA 断片を含む。その塩基配列を配列表の配列番号 2 に、また該塩基配列から推定されるザルコシンオキシダーゼアミノ酸配列を配列表の配列番号 1 に示す。

【0031】

実施例 2 改変型ザルコシンオキシダーゼ遺伝子の作製

ザルコシンオキシダーゼ遺伝子を含む発現プラスミド pSAOEP3 と、配列表の配列番号 3 記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE 製) を用いて、そのプロトコールに従って変異処理操作を行い、更に塩基配列を決定して、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 89 番目のリジンがアルギニンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド (pSAOM1) を取得した。

pSAOEP3 と、配列表の配列番号 4 記載の合成オリゴヌクレオチドおよび

これと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE 製) を用いて、上記と同様の操作により、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 155 番目のシステインがイソロイシンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド (pSAOM2) を取得した。

pSAOEP3 と、配列表の配列番号 5 記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 166 番目のアスパラギンがリジンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド (pSAOM3) を取得した。

pSAOEP3 と、配列表の配列番号 6 記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 204 番目のメチオニンがアラニンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド (pSAOM4) を取得した。

pSAOEP3 と、配列表の配列番号 7 記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 213 番目のセリンがプロリンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド (pSAOM5) を取得した。

pSAOEP3 と、配列表の配列番号 8 記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 233 番目のシステインがセリンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド (pSAOM6) を取得した。

pSAOEP3 と、配列表の配列番号 9 記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 240 番目のアスパラギンがチロシンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド (pSAOM7

)を取得した。

pSAOEP3と、配列表の配列番号10記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の250番目のグルタミン酸がグルタミンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM8)を取得した。

pSAOEP3と、配列表の配列番号11記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の364番目のアラニンがバリンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM9)を取得した。

pSAOM1と、配列表の配列番号7記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の89番目のリジンがアルギニン、213番目のセリンがプロリンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM10)を取得した。

pSAOM10と、配列表の配列番号10記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の89番目のリジンがアルギニン、213番目のセリンがプロリン、250番目のグルタミン酸がグルタミンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM11)を取得した。

pSAOM11と、配列表の配列番号4、5、11記載の各合成オリゴヌクレオチドおよびこれらと相補的な各合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作の繰り返して、配列番号1記載のアミノ酸配列の89番目のリジンがアルギニン、155番目のシステインがイソロイシン、166番目のアスパラギンがリジン、213番目のセリンがプロリン、250番目のグルタミン酸がグルタミン、364番目のアラニンがバリンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM12)を取得した。

pSAOM11と、配列表の配列番号6、8、9記載の各合成オリゴヌクレオチドおよびこれらと相補的な各合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作の繰り返しで、配列番号1記載のアミノ酸配列の89番目のリジンがアルギニン、204番目のメチオニンがアラニン、213番目のセリンがプロリン、233番目のシステインがセリン、240番目のアスパラギンがチロシン、250番目のグルタミン酸がグルタミンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM13)を取得した。

【0032】

実施例3 改変型ザルコシンオキシダーゼの作製

pSAOM1、pSAOM2、pSAOM3、pSAOM4、pSAOM5、pSAOM6、pSAOM7、pSAOM8、pSAOM9、pSAOM10、pSAOM11、pSAOM12、pSAOM13の各組み換えプラスミドでエシェリヒアコリーJM109のコンピテントセルを形質転換し、該形質転換体をそれぞれ取得した。

400mlのTerrific brothを2L容坂口フラスコに分注し、121℃、20分間オートクレーブを行い、放冷後別途無菌濾過したアンピシリンを100 μ l/mlになるように添加した。この培地に100 μ l/mlのアンピシリンを含むLB培地で予め30℃、16時間培養したエシェリヒアコリーJM109(pSAOM1)の培養液を5ml接種し、30℃で20時間通気攪拌培養した。培養終了時のザルコシンオキシダーゼ活性は、前記活性測定において、培養液1ml当たり約9.5U/mlであった。

上記菌体を遠心分離により集菌し、20mMリン酸緩衝液(pH7.5)に懸濁した後、超音波処理により破碎し、更に遠心分離を行い、上清液を粗酵素液として得た。得られた粗酵素液をポリエチレンジアミンによる除核酸および硫酸分画を行い、20mMリン酸緩衝液(pH7.5)で透析した後、DEAEセファロースCL-6B(アマシャムバイオサイエンス製)、更に1時間の熱処理により分離・精製し、精製酵素標品を得た。本方法により得られた標品は、SDS-PAGE的にほぼ単一のバンドを示した。また、この変異体をSAOM1と命名した。

pSAOM2、pSAOM3、pSAOM4、pSAOM5、pSAOM6、pSAOM7、pSAOM8、pSAOM9、pSAOM10、pSAOM11、pSAOM12、pSAOM13の各組み換えプラスミドによるエシェリヒアコリーJM109形質転換体についても上記方法と同様にして精製酵素標品を取得した。得られた酵素標品をそれぞれSAOM2、SAOM3、SAOM4、SAOM5、SAOM6、SAOM7、SAOM8、SAOM9、SAOM10、SAOM11、SAOM12、SAOM13と命名した。

【0033】

比較例1 野生型ザルコシンオキシダーゼの作製

比較例として、pSAOEP3によるエシェリヒアコリーJM109形質転換体について、上記方法と同様にして、改変前の精製酵素標品を取得した。

【0034】

実施例4 改変型ザルコシンオキシダーゼの評価1

実施例3で取得した変異型ザルコシンオキシダーゼ（SAOM1、SAOM2、SAOM3、SAOM4、SAOM5、SAOM7、SAOM8、SAOM10）および比較例1で取得した各種ザルコシンオキシダーゼをそれぞれ、50mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.5）中に5U/mlになるように加え、60℃で30分間保存した後の残存酵素活性率（%）を測定した。その結果を表1に示す。表1から判るように本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼは改変前と比べて液状安定性が向上していることが確認された。

【0035】

【表1】

改変体	変異	活性残存率 (%)
p SAOM1	K89R	34
p SAOM2	C155I	46
p SAOM3	N166K	37
p SAOM4	M204A	51
p SAOM5	S213P	47
p SAOM7	N240Y	52
p SAOM8	E250Q	31
改変前 (コントロール)	—	19

【0036】

実施例4 改変型ザルコシンオキシダーゼの評価2

実施例3で取得した変異型ザルコシンオキシダーゼ (SAOM1、SAOM2、SAOM5、SAOM6、SAOM7、SAOM8、SAOM9) および比較例1で取得した各種ザルコシンオキシダーゼをそれぞれ、2mMエチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム、50mM NaCl、0.1% (W/V) 2-メチルイソチアゾロン (ロッシュ・ダイアグノスティックス製)、0.1% (W/V) トリトンX-100を含むPIPES-NaOH緩衝液 (pH7.5) 中に5U/mlになるように加え、40℃で3日間保存した後の残存酵素活性率 (%) を測定した。その結果を表2に示す。表2から判るように本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼは改変前と比べて液状安定性が向上していることが確認された。

【0037】

【表 2】

改変体	変異	活性残存率 (%)
p SAOM1	K 8 9 R	4 1
p SAOM2	C 1 5 5 I	4 7
P SAOM5	S 2 1 3 P	4 9
p SAOM6	C 2 3 3 S	7 2
p SAOM7	N 2 4 0 Y	7 3
p SAOM8	E 2 5 0 Q	4 0
p SAOM9	A 3 6 4 V	4 5
改変前 (コントロール)	—	3 0

【0038】

実施例 5 改変型ザルコシンオキシダーゼの評価 3

実施例 3 で取得した変異型ザルコシンオキシダーゼ (SAOM1、SAOM10、SAOM11、SAOM12、SAOM13) および比較例 1 で取得した各種ザルコシンオキシダーゼの、クレアチニン測定試薬中の安定性を測定した。1 mM エチレンジアミン四酢酸ニ水素ニナトリウム、50 mM 塩化ナトリウム、0.1% (W/V) 2-メチルイソチアゾロン (ロッシュ・ダイアグノスティックス製)、0.1% (W/V) トリトン X-100、0.02% (W/V) 4-アミノアンチピリン、0.02% (W/V) TOOS (同仁化学研究所製)、100 U/ml クレアチニンアミドヒドロラーゼ (東洋紡製; CNH-211)、500 U/ml クレアチンアミジノヒドロラーゼ (東洋紡製; CRH-221)、100 U/ml ペルオキシダーゼ (東洋紡製; PEO-301) を含む 50 mM PIPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.5) に、上記のザルコシンオキシダーゼを 100 U/ml になるよう加え、35℃で2週間保存した後にザルコシンオキシダーゼ活性の残存率を測定した。その結果を表 3 に示す。表 3 から判るように本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼは改変前と比べて、クレアチニン測定試薬中での液状安定性が向上していることが確認された。

【0039】

【表3】

改変体	変異	活性残存率 (%)
pSAOM1	K89R	28
pSAOM10	K89R, S213P	44
pSAOM11	K89R, S213P, E250Q	51
pSAOM12	K89R, C155I, N166K, S213P, E250Q, A364V	77
pSAOM13	K89R, M204A, S213P, C233S, N240Y, E250Q	79
改変前 (コントロール)	—	16

【0040】

実施例6 改変型ザルコシンオキシダーゼの評価4

実施例3で取得した変異型ザルコシンオキシダーゼ (SAOM1、SAOM10、SAOM11、SAOM12、SAOM13) および比較例1で取得した各種ザルコシンオキシダーゼの、クレアチン測定試薬中の安定性を測定した。1 mMエチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム、50 mM塩化ナトリウム、0.1% (W/V) 2-メチルイソチアゾロン (ロッシュ・ダイアグノスティックス製)、0.1% (W/V) トリトンX-100、0.02% (W/V) 4-アミノアンチピリン、0.02% (W/V) TOOS (同仁化学研究所製)、50 U/ml クレアチンアミジノヒドロラーゼ (東洋紡製; CRH-221)、10 U/ml ペルオキシダーゼ (東洋紡製; PEO-301) を含む50 mM PIPES-NaOH緩衝液 (pH 7.5) に、上記のザルコシンオキシダーゼを10 U/mlになるよう加え、35℃で2週間保存した後にザルコシンオキシダーゼ活性の残存率を測定した。その結果を表3に示す。表3から判るように本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼは改変前と比べて、クレアチン測定試薬中での液状安定性が向上していることが確認された。

【0041】

【表4】

改変体	変異	活性残存率 (%)
pSAOM1	K89R	31
pSAOM10	K89R, S213P	44
pSAOM11	K89R, S213P, E250Q	52
pSAOM12	K89R, C155I, N166K, S213P, E250Q, A364V	80
pSAOM13	K89R, M204A, S213P, C233S, N240Y, E250Q	77
改変前 (コントロール)	—	14

【0042】

【発明の効果】

本発明によって、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を蛋白工学的手法により改変し、液状安定性が改良された改変型ザルコシンオキシダーゼを供給することが可能となった。本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼを、臨床的に筋疾患、腎疾患の診断の指標となっている体液中のクレアチン、クレアチニンの測定用酵素として使用することで、該試薬の液状安定性を向上させることができる。

【0043】

【配列表】

<110> Toyo Boseki Kabushiki Kaisya

<120> 安定化されたザルコシンオキシダーゼ

<130> 03-0095

<141> 2003-02-12

<160> 6

<170> PatentIn Version 2.1

<210> 1

<211> 389

<212> PRT

<213> アースロバクター・エスピー(Arthrobacter SP.) TE1826

<400> 1

Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser
1 5 10 15

Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gln Gly Val Lys Thr
20 25 30

Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His
35 40 45

Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr
50 55 60

Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys
65 70 75 80

Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly
85 90 95

Pro Lys Gly Glu Ala Pro Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys
100 105 110

Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys
115 120 125

Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu

130

135

140

Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg

145

150

155

160

Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val

165

170

175

Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Gln Thr Ala Tyr

180

185

190

Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn

195

200

205

Ser Lys Leu Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr

210

215

220

Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn

225

230

235

240

Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr

245

250

255

Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His

260

265

270

Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly

275

280

285

Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr
290 295 300

Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr
305 310 315 320

Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe
325 330 335

Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe
340 345 350

Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys
355 360 365

Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys
370 375 380

Gln Lys Glu Thr Ile
385

<210> 2

<211> 1167

<212> DNA

<213> アースロバクター・エスピー(Arthrobacter SP.) TE1826

<400> 2

atg agt att aaa aaa gat tat gat gta att gtg gtt ggc gct ggt tcc 48

Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser
1 5 10 15

atg gga atg gca gct ggg tac tat ctg tct aaa caa ggt gtt aaa aca 96
Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gln Gly Val Lys Thr
20 25 30

cta ttg gta gat tca ttt cat cct ccc cat aca aat ggc agc cat cat 14
4
Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His
35 40 45

ggc gat aca cgg atc att cgt cac gca tat ggc gaa gga aga gag tat 19
2
Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr
50 55 60

gta ccg ttt gcc ttg aga gca caa gag tta tgg tat gaa tta gaa aag 24
0
Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys
65 70 75 80

gag act cat cat aaa ata ttt aca aaa aca ggt gta ctc gtt ttt ggt 28
8
Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly
85 90 95

cct aaa gga gaa gct cct ttc gtt gcc gaa aca atg gaa gcc gca aag 33
6
Pro Lys Gly Glu Ala Pro Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys
100 105 110

gaa cat tca tta gat gtt gat tta cta gaa gga agt gaa ata aat aag 38

4

Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys

115

120

125

cgt tgg cca ggt gta acg gtt cct gag aat tat aat gct att ttt gaa 43

2

Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu

130

135

140

aaa aat tct ggt gtc tta ttt agt gaa aat tgt att cgc gct tac cgt 48

0

Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg

145

150

155

160

gaa ttg gcg gaa gca aat ggt gcg aaa gtt cta acg tac aca ccc gtt 52

8

Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val

165

170

175

gaa gat ttc gag att gcc gag gac ttc gtc aaa atc caa acc gcc tat 57

6

Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Gln Thr Ala Tyr

180

185

190

ggc tcc ttt aca gcc agt aaa tta att gtt agc atg ggc gct tgg aat 62

4

Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn

195

200

205

agc aaa ctg cta tca aaa tta aat att gaa atc cca ttg cag cca tac 67

2

Ser Lys Leu Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr

210

215

220

cgt caa gtt gtc gga ttc ttc gaa tgt gat gaa aaa aaa tat agc aat 72

0

Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn

225

230

235

240

aca cat ggt tat ccg gcg ttc atg gtc gaa gtc cca act ggc atc tat 76

8

Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr

245

250

255

tac gga ttt cca agc ttc ggc ggc tgc ggc ttg aaa ata ggc tat cat 81

6

Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His

260

265

270

acg tat ggt caa aaa atc gat cca gat acg att aat cgt gaa ttt ggt 86

4

Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly

275

280

285

att tac ccg gag gat gaa ggg aat att cgc aaa ttc ctg gaa aca tat 91

2

Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr
290 295 300

atg ccg gga gca acc ggc gaa tta aaa agt ggg gca gtt tgc atg tac 96

0

Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr
305 310 315 320

aca aaa aca cct gat gag cat ttc gtg att gat tta cat cct caa ttc 100

8

Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe
325 330 335

tcg aat gtc gcg att gca gcc gga ttc tcc gga cat ggg ttt aaa ttc 105

6

Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe
340 345 350

tca agc gta gtt ggt gaa aca tta agt caa tta gct gta acc ggt aaa 110

4

Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys
355 360 365

aca gaa cac gat att tcc atc ttt tca atc aat cgc cct gct tta aaa 115

2

Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys
370 375 380

caa aaa gaa acg att 116

7

Gln Lys Glu Thr Ile

385

<210> 3

<211> 38

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 3

gactcatcat aaaatattta caagaacagg tgtactcg 38

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 4

gtgtcttatt tagtgaaaat attattcgcg cttacc 36

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 5

gaattggcgg aagcaaaagg tgcgaaagtt ctaacg 36

<210> 6

<211> 38

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 6

gccagtaaataaattgttagcgcgggcgcttggaatag 38

<210> 7

<211> 38

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 7

gaatagcaaa ctgctaccaa aattaaatat tgaaatcc 38

<210> 8

<211> 36

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 8

gtc gga ttc ttc gaa agc gat gaa aaa aaa tat agc 36

<210> 9

<211> 38

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 9

gtgatgaaaaaaaatatagctatacacatgttatccg 38

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 10

ccggcgttca tgggccaggt cccaactggc atc 33

<210> 11

<211> 37

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 11

gaaacattaa gtcaattagt tgtaaccggt aaaacag 37

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】本発明は、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を蛋白工学的手法により改変することにより得られる、液状での安定性が向上したザルコシンオキシダーゼ、その製造法および用途に関する。

【解決手段】ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸を付加、欠失、挿入あるいは置換により変換した蛋白質であって、ザルコシンオキシダーゼ活性を有し、液状での安定性が変換前に比べて向上していることを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼ。

特願 2003-033641

出願人履歴情報

識別番号

[000003160]

1. 変更年月日
[変更理由]
住 所
氏 名

1990年 8月10日
新規登録
大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
東洋紡績株式会社